



**University of
Zurich**^{UZH}

**Zurich Open Repository and
Archive**

University of Zurich
University Library
Strickhofstrasse 39
CH-8057 Zurich
www.zora.uzh.ch

Year: 2009

EGFR-Status beim Lungen-Adeno-Ca

Soltermann, A ; Tischler, V

Abstract: Das Lungenkarzinom ist eine heterogene Tumorentität die mit molekularen Markern zunehmend genauer unterteilt wird. Diese Marker haben diagnostische, prädiktive oder prognostische Bedeutung. Damit wird eine individuellere und damit wirksamere bzw. nebenwirkungsärmere Therapie ermöglicht.

Posted at the Zurich Open Repository and Archive, University of Zurich

ZORA URL: <https://doi.org/10.5167/uzh-44041>

Journal Article

Published Version

Originally published at:

Soltermann, A; Tischler, V (2009). EGFR-Status beim Lungen-Adeno-Ca. Leading Opinions. Hämatologie Onkologie, (5):64-66.

SAMO*

EGFR-Status beim Lungen-Adeno-Ca

Das Lungenkarzinom ist eine heterogene Tumorentität die mit molekularen Markern zunehmend genauer unterteilt wird. Diese Marker haben diagnostische, prädiktive oder prognostische Bedeutung. Damit wird eine individuellere und damit wirksamere bzw. nebenwirkungsärmere Therapie ermöglicht.

Der Unterteilung des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms in Adeno- bzw. Plattenepithelkarzinom und der Bestimmung des EGFR-Mutationsstatus des Adenokarzinoms kommt zentrale Bedeutung zu. Die chemotherapeutische Kombination Erlotinib (EGFR-Inhibitor) und Bevacizumab (VEGF-Inhibitor) wird als Erstlinien-Therapie beim fortgeschrittenen Adenokarzinom inzwischen standardmässig eingesetzt. Das Ansprechen auf Erlotinib ist einerseits aber mit dem Vorhandensein einer EGFR-Mutation verbunden, andererseits ist Bevacizumab wegen Blutungskomplikationen beim Plattenepithelkarzinom kontraindiziert.

Histotyp und Subtyp

Durch die neuen Erkenntnisse der Molekularpathologie der Lungenkarzinome kommt interessanterweise der exakten histologischen Klassifikation zunehmende Bedeutung zu. Gemäss WHO-Definition wird das Lungenkarzinom unterteilt in nicht kleinzellig versus kleinzellig, wobei der Begriff nicht kleinzellig die drei Histotypen Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom und grosszelliges Karzinom umfasst.¹ Diese Einteilung be-



A. Soltermann, Zürich



V. Tischler, Zürich

„Auf grosses Interesse stossen prädiktive Biomarker, welche ein Ansprechen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen können, da sowohl Kosten wie auch schwere Nebenwirkungen reduziert werden. Der wichtigste prädiktive Marker für das Lungenkarzinom ist derzeit EGFR.“

ruht auf Kriterien, die am HE(Hämatoxylin-Eosin)- bzw. AB-PAS(Alcianblue-Periodic Acid Schiff)-Schnitt definiert sind: Kleinzellig heisst, dass die Durchmesser der Tumorzellen <3 Lymphozytendurchmesser, damit <30 Mikrometer betragen. Für ein Adenokar-

zinom (AD) wird der Nachweis einer glandulären Differenzierung oder die Bildung von saurem Muzin gefordert, welches sich in der AB-Färbung hellblau darstellt. Solche Schleimtropfen müssen in jeweils 5 Tumorzellen in zwei Gesichtsfeldern bei hoher Vergrösserung auftreten. Das Plattenepithelkarzinom (SQ) weist Verhornung und/oder Interzellularbrücken auf. Karzinome bestehend aus Tumorzellen mit grossen blässigen Kernen mit prominenten Nukleolen, aber ohne Schleimbildung oder Verhornung, werden als grosszellig (LC) bezeichnet.

Das Adenokarzinom wird in die 4 Subtypen glandulär-azinäer (AC), bronchiolo-alveolär (BAC), solid (SOL) und papillär (PAP) eingeteilt.² Das BAC wird subklassifiziert in BAC muzinös und BAC nicht muzinös. Die meisten Adenokarzinome setzen sich aus Mischungen dieser Subtypen zusammen, welche histologisch

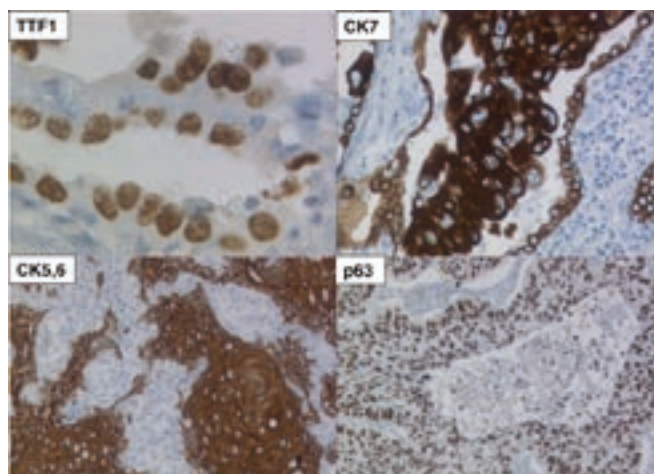


Abb. 1: Immunhistochemisches 4-er-Panel zur Differenzierung von Adeno- und Plattenepithelkarzinom. TTF1 bei nicht muzinösem BAC Adeno-Subtyp. CK7 bei solidem Subtyp, randlich nicht neoplastische Pneumozyten. CK5,6 bei infiltrativ wachsendem Plattenepithelkarzinom. P63 bei Plattenepithelkarzinom mit zentraler Nekrose

Gesamtüberleben

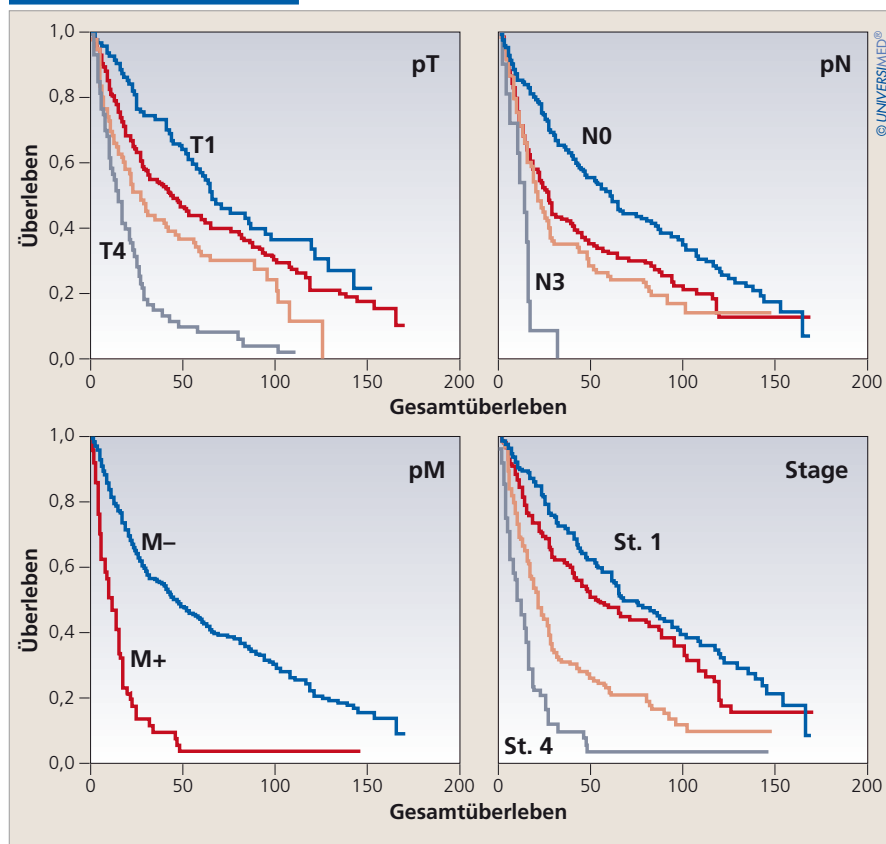


Abb. 2: Gesamtüberleben in Monaten unserer Zürcher NSCLC-Kohorte nach pT, pN und pM sowie Tumorstadium (Kaplan-Meier, Log-Rank-Test). Einschluss von 532 operierten Patienten 1993–2002 mit 5-Jahres-Überleben; 250 (47%) Adeno-, 262 (49%) Plattenepithel- und 20 (4%) adenosquamöse Karzino-
me. Alle p-Werte <0,001

rationspräparates mit vollständig aufgearbeitetem Primärtumor mittels der erwähnten histochemischen Färbungen in den meisten Fällen vornehmen. Allerdings sind Histotyp-Kombinationen wie z.B. das adenosquamöse Karzinom (AQ) nicht selten. Wesentlich schwieriger wird die Klassifikation in kleinen Bronchialbiopsien, Pleuraergüssen oder Metastasen-Punktaten. Dieses Gewebematerial wird typischerweise von Patienten mit fortgeschrittenem, Chemotherapie-bedingtem Tumor gewonnen. Hier kommt man häufig nur zur Aussage, dass es sich um ein wenig differenziertes, nicht kleinzelliges Karzinom handelt. Biopsien, zytologische Ausstriche oder auch zytologische Zellblöcke können immunhistochemisch mit einem 2-er (TTF1/CK5,6)- oder ev. 4-er (TTF1/CK7 versus CK5,6/p63)-Antikörper-Panel weiter untersucht werden. Die Marker TTF1 (Thyroid-Transcription Factor 1) und CK7 (Zytokeratin 7) sind assoziiert mit Adeno-, CK5,6 (Zytokeratin 5/6) und p63 mit Plattenepithelkarzinom (Abb. 1). TTF1 ist sehr spezifisch für das Adenokarzinom, allerdings beim muzinösen BAC sowie dem soliden Subtyp häufig nicht nachweisbar, was die Sensitivität verringert. P63 wiederum weist eine mässige Spezifität für die Plattenepitheldifferenzierung auf, da 25% der Adenokarzinome dieses Protein exprimieren.

Prognose und Prädiktion

Die Prognose des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms lässt sich anhand des klinisch-pathologischen TNM-Stadiums gut ableiten (Abb. 2). Die TNM-Klassifikation wurde in den letzten Jahren überarbeitet und sollte spätestens bis 1. Januar 2010 als neue 7. Auflage angewendet werden.⁴ Prognostische Marker sind hauptsächlich für Patienten mit operierten pT1/2-Tumoren von Bedeutung, da in diesem Stadium nach der Operation keine weitere Therapie erfolgt. Auf grosses Interesse stossen prädiktive Biomarker, welche ein Anspre-

beschrieben und in Zukunft ev. in Prozenten angegeben werden müssen. Damit wird auch der Begriff bronchiolo-alveoläres Karzinom in Abgrenzung zum „normalen Adenokarzinom“ obsolet. Diese Subtypen haben klinische Bedeutung, da EGFR-Mutationen häufiger beim papillären Adenokarzinom gefunden werden, was die Frage nach der molekularen Tumorerogenität bzw. einem zukünftigen Tumor-Mapping aufwirft.³ Das solide Wachstumsmuster entspricht einem Tumorgad 3 und ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose.

Immunhistochemie

Diese Klassifikationen lassen sich bei Vorliegen eines Ope-

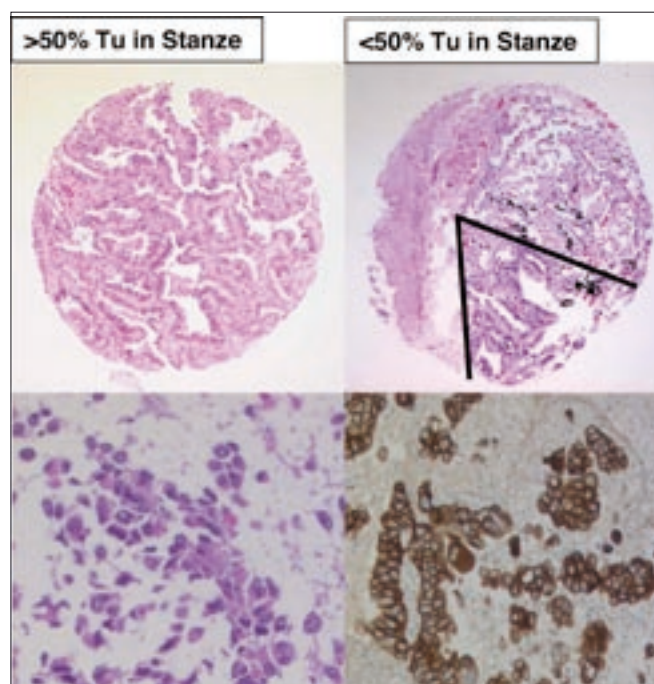


Abb. 3: Stanze aus Operationspräparat mit >50% tumorhaltiger Oberfläche (links oben) oder <50%, nur im markierten Sektor, angrenzend Gefässanschnitt bzw. Lungenalveolen mit Anthrakose (rechts oben). Zellblock-Oberfläche mit ausschliesslich Tumorzellen aus Lymphknoten-FNP (links unten). EGFR-IHC mit membranärer Proteineexpression Score 3 (rechts unten)

chen auf eine bestimmte Therapie vorhersagen können, da sowohl unnötige Kosten wie auch schwere Nebenwirkungen reduziert werden. Der wichtigste prädiktive Marker für das Lungenkarzinom ist derzeit EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor, HER1).

EGFR

EGFR ist eine Zellmembranständige Rezeptortyrosinkinase, deren tumorale Aktivität mit verschiedenen Inhibitoren geblockt werden kann. Diese Inhibition ist speziell effektiv, wenn im Rahmen der sogenannten onkogenen Abhängigkeit (Oncogene Addiction) weitere Rezeptoren wie HER2, HER3 und HER4 ausfallen und zusätzlich bestimmte Mutationen im EGFR-Molekül auftreten.⁵ Neben Sensitivitätsmutationen wie L858R gibt es inzwischen nach Therapie oder auch primär Resistenzmutationen wie T790M. Der Stellenwert einer erhöhten Genkopie-Zahl von EGFR ist kontrovers diskutiert, scheint tendenziell aber von Wichtigkeit zu sein.^{6, 7} Problematisch sind dabei technische Aspekte, insbesondere die Schnittdicke. Für die FISH-Analyse werden routinemässig 5 Mikrometer dicke Schnitte angefertigt. Der Tumorzellkern weist jedoch einen Durchmesser von >30–50 Mikrometer auf. Dies bedeutet, dass nur ein Teil der Genkopien pro Kern (sog. Nuclear Truncation) ausgezählt wird, sodass eine adäquate Normalisierung des Scores erforderlich ist. Der EGFR-Status in unserem Institut umfasst zurzeit eine Genotypisierung der Exone 18–21 mittels PCR und direkter Sequenzierung, eine Messung der Genkopie-Zahl mittels FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization) und eine immunhistochemische Bestimmung der Proteinexpression (Abb. 3 und 4). Diese Analysen können auch an Biopsien oder Zellblöcken von zyto-

logischen Flüssigkeiten bzw. Punkttaten durchgeführt werden, unter der Voraussetzung, dass genügend Tumorzellen vor-

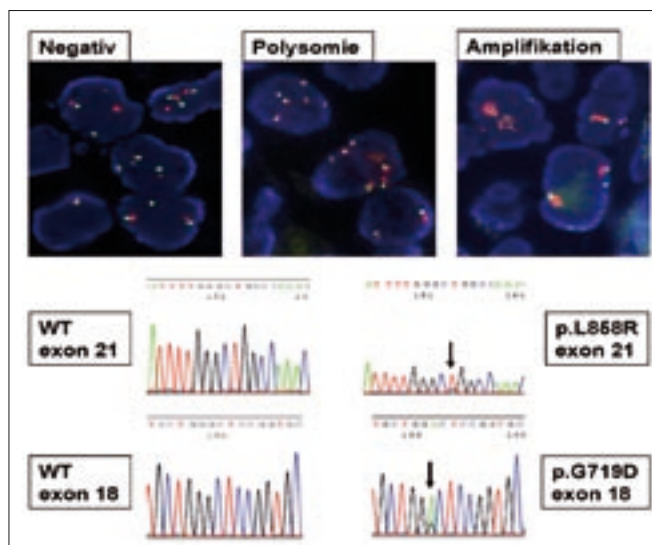


Abb. 4: Oberes Panel: EGFR-FISH mit Beispiel für normal, hochgradige Polysomie (≥ 4 Kopien in 40% der Zellen) und Amplifikation (Clusters). Unteres Panel: EGFR-Genotypisierung mittels PCR. Nachweis von Punktmutation L858R in Exon 21 bzw. G719D in Exon 18. Mutationspeak < bzw. > als Wildtyp-Hintergrund

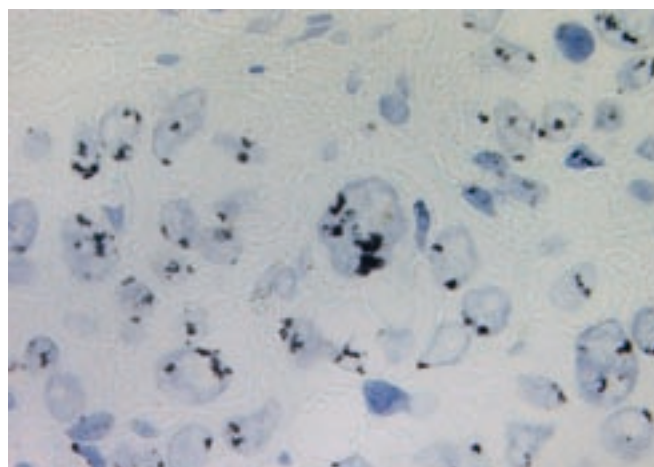


Abb. 5: Beispiel einer EGFR-Amplifikation mittels SISH (Silver In-Situ Hybridization) mit Signalfarbe in Schwarz (Centromer-Kontrollen in Rot auf separatem Schnitt nicht dargestellt)

handen sind und deren Anteil >50% aller Zellen beträgt, um einen falsch-negativen Verdünnungseffekt zu vermeiden. Es wird deshalb routinemässig eine Anreicherung durch Mikrodissektion mit einer 600-Mikrometer-Stanze durchgeführt. Für die FISH-Untersuchung müssen mindestens 100 Zellen ausgezählt werden. Die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop ist relativ aufwendig. Die Vermehrung der EGFR-Genkopien kann neuerdings aber auch mit SISH (Silver In-Situ Hybridization) in schwarzer Signalfarbe (Abb. 5) dargestellt werden,

was ein Arbeiten am Lichtmikroskop bei Tageslicht ermöglicht.

Literatur:

- ¹ Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. 1st ed. Kleihues P, Sobin LH, editors. Lyon: IARC Press; 2004
- ² Kerr KM: Pulmonary adenocarcinomas: classification and reporting. *Histopathology* 2009; 54(1): 12-27
- ³ Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW et al: Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. *Am J Surg Pathol* 2008; 32(6): 810-27
- ⁴ Travis WD: Reporting lung cancer pathology specimens. Impact of the anticipated 7th Edition TNM classification based on recommendations of the IASLC Staging Committee. *Histopathology* 2009; 54(1): 3-11
- ⁵ Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA: Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(3): 169-81
- ⁶ Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L et al: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(9): 643-55
- ⁷ Bunn PA, Jr, Dziadziuszko R, Varela-Garcia M, Franklin WA, Witta SE, Kelly K et al: Biological markers for non-small cell lung cancer patient selection for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Clin Cancer Res* 2006; 12(12): 3652-6

* Swiss Academy of Multidisciplinary Oncology

Autoren:

Dr. med. Alex Soltermann,
Dr. med. Verena Tischler
Institut für Klinische Pathologie
Universitätsspital Zürich
Schmelzbergstrasse 12,
8091 Zürich, Schweiz

Quelle:

SAMO Interdisciplinary Workshop on Chest Tumors, 23.u. 24. Oktober 2009, Luzern
Loonk090500